

Nitric Oxide Donor 첨가가 구리 결핍 배아의 발달과 Nitric Oxide 하위 신호전달체계에 미치는 영향*

양수진[§] · Keen, Carl L · Uriu-Adams, Janet Y

캘리포니아 데이비스대학교 영양학과

Effects of Nitric Oxide Donor Supplementation on Copper Deficient Embryos and Nitric Oxide-Mediated Downstream Signaling*

Yang, Soo Jin[§] · Keen, Carl L · Uriu-Adams, Janet Y

Department of Nutrition, University of California at Davis, Davis, CA 95616, USA

ABSTRACT

One suggested mechanism underlying copper (Cu) deficiency teratogenicity is a low availability of nitric oxide (NO), a signaling molecule which is essential in developmental processes. Increased superoxide anions secondary to decreased activities of Cu-zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) in Cu deficiency can interact with NO to form peroxynitrite, which can nitrate proteins at tyrosine residues. In addition, peroxynitrite formation can limit NO bioavailability. We previously reported low NO availability and increased protein nitration in Cu deficient (Cu-) embryos. In the current study, we tested whether Cu deficiency alters downstream signaling of NO by assessing cyclic GMP (cGMP) and phosphorylated vasodilator-stimulating phosphoprotein (VASP) levels, and whether NO supplementation can affect these targets as well as protein nitration. Gestation day 8.5 embryos from Cu adequate (Cu+) or Cu- dams were collected and cultured in either Cu+ or Cu- media for 48 hr. A subset of embryos was cultured in Cu- media supplemented with a NO donor (DETA/NONOate; 20 μ M) and/or Cu-Zn SOD. Cu-/Cu- embryos showed a higher incidence of embryonic and yolk sac abnormalities, low NO availability, blunted dose-response in NO concentrations to increasing doses of acetylcholine, low mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), increased levels of 3-nitrotyrosine (3-NT) compared to Cu+ /Cu+ controls. cGMP concentrations tended to be low in Cu-/Cu- embryos, and they were significantly lower in Cu-/Cu- yolk sacs than in controls. Levels of phosphorylated VASP at serine 239 (P-VASP) were similar in all groups. NO donor supplementation to the Cu- media ameliorated embryonic and yolk sac abnormalities, and resulted in increased levels of cGMP without altering levels of P-VASP and 3-NT. Taken together, these data support the concept that Cu deficiency limits NO availability and alters NO/cGMP-dependent signaling in Cu- embryos and yolk sacs, which contributes to Cu deficiency-induced abnormal development. (*Korean J Nutr* 2008; 41(8): 691~700)

KEY WORDS: copper deficiency, nitric oxide, oxidative stress, cyclic GMP, phosphorylated vasodilator-stimulating phosphoprotein.

서 론

Nitric oxide (NO)는 L-아르기닌을 기질로 NO synthase (NOS)에 의해 생성되고, 평활근 이완, 신경전달, 면역 반응

등을 조절하는 신호전달물질이다.^{1,2)} NO는 배란, 수정란의 착상 및 배아 형성 과정 등의 초기 발달 과정들과 배아 및 태아의 발달 과정을 조절한다. 혈액 내 NO 농도는 배란기에 증가하고,³⁾ NOS 억제제 처리는 배란과 초기의 배아 형성을 저해하게 된다.^{4,5)} 착상 전 단계의 쥐 배아에서 다량 생성되는 NO는 혈관 투과성을 증가시키고 수정란이 착상되는 자궁 내벽 부위의 안정성을 유지시켜 착상 과정을 조절한다.⁶⁾ 또한, NO는 폐, 심혈관계 및 골격계의 발달을 조절하고,⁷⁻⁹⁾ 난황낭 혈관계 발달에 있어 필수적이다.¹⁰⁾

발달 과정에 있어 NO의 중요성은 NOS 억제제 혹은 NOS knockout 쥐를 대상으로 한 연구결과들에 의해 뒷받침되고

접수일 : 2008년 10월 20일 / 수정일 : 2008년 11월 12일

채택일 : 2008년 11월 15일

*This work was supported by National Institutes of Health Grant HD-26777 and a gift from the International Copper Association.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : soojyang@umich.edu

있다. NOS 억제제를 처리한 설치류 동물들은 배란, 수정 및 수정란 착상의 감소, 유산, 다리 발달 저해, 뒷다리 부위의 출혈, 난황낭 혈관 발달의 억제, 혈관병증을 보였다.¹⁰⁻¹³⁾ Endothelial NOS (eNOS) knockout 쥐의 경우 어른 쥐에서는 배란과 난자 성숙의 이상이 보고되었고,¹⁴⁾ 신생 쥐에서는 태내 성장지연, 폐, 심장, 다리의 기형 및 증가된 사망률이 보고되었다.^{9,15-17)}

발달 과정 조절인자로서의 기능 이외에도 NO는 다양한 생체 기능을 조절하는 중요한 신호전달 물질로 작용한다. NO는 soluble guanylyl cyclase (sGC)를 활성화시키고, 이 활성화된 sGC는 GTP를 기질로 한 cyclic GMP (cGMP) 생성을 증가시킨다.¹⁾ 생성된 cGMP는 protein kinase G (PKG)와 같은 cGMP-dependent protein kinase들을 활성화시키게 되는데, PKG의 가장 잘 알려진 기질들 중 하나는 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)이다. VASP의 239번 serine에서의 인산화 (phosphorylation of VASP; P-VASP)는 NO/cGMP 경로에 의존적이므로 NO/cGMP 신호전달과 혈관내피세포 기능이상의 표지인자로 간주된다.¹⁸⁾ 또한, 이는 구리 chelation에 의한 산화적 스트레스 조건하에서 NO 대사의 변화 정도를 반영한다.^{19,20)}

임신기간 동안의 구리 영양 결핍은 다양한 유형의 기형을 유발한다. 구리 결핍에 의한 기형 유발의 주요 양상은 조기 배아 사망과 심장, 골격계, 폐, 혈관계, 신경계에서의 구조적 이상들이다.²¹⁻²⁵⁾ 구리 결핍 배양액에서 48시간 배양된 gestation day (GD) 10.5의 구리 결핍 쥐 배아의 경우 위와 같은 발달 이상들을 보여주었고, 뇌, 심장 그리고 난황낭이 주로 영향을 받았다.^{26,27)} 이와 같은 구리 결핍으로 인한 기형 발생은 구리 함유 효소들의 감소된 활성과 그로 인한 이차적인 영향들로 인한 것으로 간주된다.

구리 결핍으로 인한 기형 발생의 발생기전 중 하나로 copper-zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD)의 활성 감소로 인한 산화적/nitrosative 스트레스의 증가가 주목을 받고 있다. Cu-Zn SOD의 감소된 활성으로 인해 증가된 superoxide anions은 NO와 빠른 속도로 반응하여 peroxynitrite를 생성한다. Peroxynitrite는 표적 단백질의 타이로신 아미노산 잔기에서의 nitration을 일으키고, NO의 생물학적 이용도를 감소시킴으로써 생체 내 조직과 기관들의 정상적인 생성과 발달을 저해시킨다.^{28,29)} 구리 결핍 배양액에서 48시간동안 배양된 GD 8.5의 구리 결핍 쥐 배아의 anterior 신경관의 신경상피 부위에서 3-nitrotyrosine (3-NT)의 증가된 발현이 보고되었고, 이는 증가된 peroxynitrite 형성으로 인한 것이다.²⁶⁾ 구리 결핍 배아에서 증가된 3-NT는 구리, Cu-Zn SOD, SOD 촉진제인 Tiron, glu-

tathione peroxidase의 첨가에 의해 감소되었다.²⁶⁾ 구리 결핍 배아에서의 단백질 nitration의 증가는 다른 연구 논문에서도 보고되었으나,³⁰⁾ 아직까지 구리 결핍이 난황낭에서의 단백질 nitration에 미치는 영향은 보고되지 않았다.

NO의 생물학적 이용도의 감소는 동맥경화증, 고혈압, 고콜레스테롤혈증, 당뇨 등의 병리적 상황들에서의 산화적 스트레스와 밀접하게 연관되어 있다.³¹⁻³⁴⁾ 이는 1) NOS 활성 억제로 인한 NO 생성의 감소 혹은 2) NO의 증가된 분해로 인한 것으로 간주되고 있는데, 둘 다 산화적 스트레스 상황에서 증가되는 것으로 알려져 있다. 구리 결핍이 NO의 생성과 분해에 미치는 영향에 대한 직접적인 연구 결과는 아직까지 보고되지 않았지만, 구리 결핍이 NO에 의존적인 혈관 확장을 억제시킨다는 연구 결과들은 구리 결핍이 NO의 생성 및 분해에 직접적으로 관여할 수 있다는 것을 시사한다.^{30,35,36)}

본 연구에서는 구리 결핍이 NO 하위 신호전달체계에 영향을 미치는지를 착상 후 단계의 배아와 난황낭을 대상으로 알아보았다. 또한, NO donor의 첨가가 구리 결핍 배아의 기형 발생과 NO 대사 및 NO 하위 신호전달체계의 개선에 기여하는지를 평가함으로써 구리 결핍으로 인한 기형 발생의 기전과 임신 기간 중의 적절한 구리 영양의 중요성을 제시하고자 한다.

연구방법

실험동물 및 실험식이

실험동물로는 생후 6주된 CD-1계 암컷 쥐 (Charles River Laboratories, Hollister, CA, USA)를 구입하여 표준 사료를 일주일간 공급하여 환경에 적응시킨 후 실험식이 공급을 시작하였다.

실험식은 구리 정상 식이 (8.0 μg Cu/g diet, Cu+) 혹은 구리 결핍 식이 (<0.5 μg Cu/g diet, Cu-)로 구성하였으며 탈이온수와 함께 자유급식방법으로 3주간 급여하였다. 구리 결핍 식이군에 배치된 쥐들에게는 처음 2주간 구리 chelator인 triethylenetetramine (TETA; Sigma, St. Louis, MO, USA)이 1%(w/w) 함유된 구리 결핍 식이가 제공되었고, TETA가 포함되지 않은 구리 결핍 식이가 다음 1주간 제공되었다.

3주간의 식이 급여 이후, 암컷 쥐들은 같은 계통의 수컷 breeder와 교배되어졌다. 1~2마리의 암컷 쥐와 1마리의 수컷 쥐가 하루 밤 동안 교배되었으며 다음날 아침에 질전 (vaginal plug)이 존재하는 경우 GD 0.5로 간주되었다. 임신한 쥐들은 GD 8.5에 희생되었고, 난황낭과 함께 배아들이 수집되어졌다. 상기의 절차는 University of California

at Davis의 Animal Use and Care Administrative Advisory Committee에 의해 승인되었다.

전배아 배양 (Whole embryo culture) 및 시료 수집

3~5개의 체절 (somite)을 가지는 구리 정상 혹은 구리 결핍 배아들이 GD 8.5에 모체의 자궁으로부터 standard technique을 사용하여 분리되었다.²⁷⁾ 같은 군에서 분리된 2~3개의 배아들은 구리 정상 ($18.82 \pm 0.24 \mu\text{M Cu}$) 혹은 구리 결핍 배양액 ($2.42 \pm 0.38 \mu\text{M Cu}$)에서 48시간 동안 37°C에서 배양되었다. 배양액은 75%의 수컷 쥐 혈청과 25%의 Tyrode's buffer로 구성되었다.²⁷⁾ NO 혹은 superoxide anions 농도를 조절하는 것이 구리 결핍으로 인한 기형발생을 감소시킬 수 있는지 알아보기 위해, 일부 구리 결핍 배아들은 NO donor인 DETA/NONOate ($20 \mu\text{M}$, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 혹은 Cu-Zn SOD (800 U/mL , Sigma, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 구리 결핍 배양액 ($2.10 \pm 0.60 \mu\text{M Cu}$)에서 배양되었다. 따라서, 1) Cu+/Cu+, 2) Cu-/Cu-, 3) Cu-/Cu- + NO donor, 4) Cu-/Cu- + Cu-Zn SOD, 5) Cu-/Cu- + NO donor + Cu-Zn SOD의 5개의 군이 본 연구를 위해 사용되었다.

배아의 형태와 발달 상태는 광학 현미경에 의해 평가되었고 Brown의 평가법³⁷⁾을 사용하여 점수를 매겼다. 48시간 배양과 발달 상태 평가 후 배아와 난황낭은 NO 농도 측정과 아세틸콜린에 대한 dose-response 실험에 바로 사용되어졌거나, 면역 분석을 위해 즉시 -40°C에 냉동 보관되었다. 일부 배아와 난황낭은 mRNA 발현 분석을 위해 RNA stabilization solution (RNAlater; Ambion, Austin, TX, USA)에 보관되어졌다.

분석방법

Nitric oxide 농도

48시간 동안의 배양 이후 배아와 난황낭은 96-well microplate의 well에 담겨졌고 200 μL 의 Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRBB, Sigma)가 각각의 well에 가해졌다. NOS의 기질인 L-아르기닌 ($200 \mu\text{M}$, Sigma)은 NOS 억제제인 N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 10 mM ; Calbiochem)이 가해진 negative control well을 제외한 모든 well에 가해졌고, 일부 well에는 구리 결핍 배아와 난황낭이 NOS 촉진제인 아세틸콜린에 대해 구리 정상군과 다른 양상의 dose-response를 보이는지를 평가하기 위해 10 nM ~ 100 mM 범위의 아세틸콜린이 첨가되었다. 37°C에서 2시간 동안 배양된 후 plate는 $2,500 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원

심분리 되었다. 원심분리 후 상층액이 수집되었고 즉시 NO 측정에 이용되거나 분석될 때까지 -40°C에 보관되었다. 40 μL 의 상층액이 NO 분석기 (Sievers Nitric Oxide Analyzer 280i, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA)에 주입되었고, 염산에 용해된 vanadium (III) chloride (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)를 환원제로 사용하여 총 NO (nitrate + nitrite + nitrosothiols)가 95°C에서 측정되었다. 표준 곡선은 여러 농도의 sodium nitrate (Sigma)를 주입함으로써 생성되었고, 시료의 NO 농도 계산에 사용되었다. NO 농도는 nmol NO/mg of embryo or yolk sac protein으로 표시되었다.

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNeasy Micro kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 총 RNA가 분리되었고, 5 μg 의 총 RNA가 cDNA를 만들기 위해 사용되었다. RT-PCR은 SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 사용한 two-step reaction system으로 행해졌고, iCycler real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 의해 mRNA의 발현이 정량화되었다. Neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), eNOS, 18S에 대한 primer와 TaqMan probe는 Applied Biosystem으로부터 구입되었다. 시료 cDNA가 생략된 negative control을 포함한 모든 PCR 반응은 세 번 반복되었다. 사용된 PCR 조건은 다음과 같다: 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 40 주기의 denaturation (95°C에서 15초)과 annealing/extension (60°C에서 1분). Threshold cycle (Ct)은 iCycler iQ 프로그램에 의해 측정되었고 표적과 18S cDNA 간의 차이인 ΔCt 가 통계분석에 사용되어졌다.

Cyclic GMP

cGMP 농도는 cGMP 효소 면역분석 kit (Assay Design, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 측정하였다. 시료들은 단백질 분해효소 억제제가 첨가된 lysis buffer를 가하여 균질화한 후 4°C에서 30분간 방치시켰고, 30분 후 $10,000 \times \text{g}$ 에서 15분간 4°C에서 원심분리한 후 상층액이 수집되었다. 상층액은 acetic anhydride와 triethylamine에 의해 아세틸화되었고, microplate reader (Wallac Victor2 microplate reader, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도가 측정되었다. cGMP 농도는 표준 곡선을 이용하여 계산되었고 pmol cGMP/mg protein

으로 표시되었다.

3-nitrotyrosine

3-NT 농도는 3-NT 효소 면역분석 kit (Update Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)을 사용하여 측정되었다. 시료의 3-NT 농도는 nitrated bovine serum albumin (BSA)을 이용한 표준 곡선을 사용하여 계산되었고, μg nitrated BSA equivalents/mg protein으로 표시되었다.

Western blot analysis

배아 혹은 난황낭으로부터 추출된 단백질을 4~20% gradient Tris-HCl SDS-PAGE gels에 전기 영동시켜 분리시킨 후, PVDF membrane에 transfer시켰다. Membrane을 Tris-buffered saline/Tween 20 (TBST; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 5% 함량의 우유 분말을 가하여 만든 blocking solution에 담가 1시간 동안 실온에 놓아두었고, blocking solution 제거 후 희석된 rabbit anti-P-VASP (Ser 239) 항체 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)에 담가 하루 밤 동안 4°C에 놓아두었다.

TBST를 사용하여 membrane을 15분 동안 3번 세척한 후 horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA)의 희석액과 함

께 1시간 동안 놓아두었다. 3번의 세척 후, ECL detection reagent (Amersham BioSciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 membrane 위에 가해주고 12 비트 카메라가 부착된 Chemidoc XRS gel scanner (Bio-Rad)로 스캔하여 densitometry에 의해 밴드의 화학발광 (chemiluminescence) 정도를 정량화하였다. Membrane의 항원에 결합된 항체를 제거하기 위해 stripping시킨 후 anti-VASP 항체 (Cell Signaling Technology)를 사용하여 위 과정을 반복하였고, 이는 P-VASP western band의 화학발광 강도를 VASP western band의 것으로 normalization하기 위해 사용하였다.

통계분석

실험의 결과는 SPSS 14.0 프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 구하였다. 모체 및 배양액 구리 농도, NO donor와 Cu-Zn SOD의 첨가가 배아와 난황낭의 발달, NO 농도, NOS isoform들의 mRNA 발현, cGMP와 3-NT의 농도, VASP 인산화에 미치는 영향은 one-way ANOVA에 의해 검증되었다. 각 군별 차이는 LSD post-hoc test로 분석하였다.

각 군 간의 발달 이상 빈도수의 차이는 chi-square 검정을 통하여 통계적 유의성을 분석하였다. 모든 결과는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Table 1. Effects of NO donor and SOD supplementation to Cu deficient media on *in vitro* embryo and yolk sac development

	Cu+/Cu+	Cu-/Cu-	Cu-/Cu- + NO donor	Cu-/Cu- + SOD	Cu-/Cu- + NO donor + SOD
Embryos examined (number)	86	36	33	34	32
Somite pairs (number)	32.3 \pm 0.1 ¹⁾	32.0 \pm 0.2	32.1 \pm 0.1	32.1 \pm 0.2	32.1 \pm 0.1
Crown-rump length (mm)	4.4 \pm 0.0	4.3 \pm 0.1	4.4 \pm 0.0	4.3 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1
Developmental score	41.9 \pm 0.4 ^{a2)}	39.8 \pm 0.9 ^b	42.3 \pm 0.3 ^a	40.7 \pm 0.6 ^{ab}	39.8 \pm 1.1 ^b
Percentage of embryos with one or more embryo or yolk sac anomalies (%)	24.4 ^a	77.8 ^b	36.4 ^{ac}	61.8 ^{bd}	43.8 ^{cd}
Percentage of embryos with one or more yolk sac anomalies (%)	14.0 ^a	63.9 ^b	15.2 ^{ac}	38.2 ^d	31.3 ^{cd}
Abnormal vascularization (%)	12.8 ^a	58.3 ^b	15.2 ^{ac}	29.4 ^c	25.0 ^{ac}
Blood pooling (%)	9.3 ^a	36.1 ^b	12.1 ^{ac}	23.5 ^{bc}	12.5 ^{ac}
Blood islands (%)	3.5 ^a	25.0 ^{bc}	0 ^a	14.7 ^{bc}	9.4 ^{ac}
Percentage of embryos with one or more heart anomalies (%)	4.7 ^a	22.2 ^b	3.0 ^a	11.8 ^{ab}	9.4 ^{ab}
Abnormal/swollen heart (%)	0 ^a	8.3 ^b	0 ^{ab}	2.9 ^{ab}	0 ^{ab}
Pericardium effusion (%)	4.7 ^a	16.7 ^b	3.0 ^{ab}	8.8 ^{ab}	9.4 ^{ab}
Percentage of embryos with one or more brain anomalies (%)	10.5 ^a	41.7 ^{bc}	21.2 ^{ac}	50.0 ^b	34.4 ^{bc}
Forebrain hypoplasia (%)	1.2 ^a	2.8 ^{ab}	3.0 ^{ab}	11.8 ^b	3.1 ^{ab}
Microcephaly (%)	2.3 ^a	8.3 ^{ab}	3.0 ^{ab}	2.9 ^{ab}	12.5 ^b
Hindbrain distension (%)	4.7 ^a	11.1 ^{ab}	9.1 ^{ab}	20.6 ^b	3.1 ^a
Open anterior neuropore (%)	1.2 ^a	13.9 ^b	3.0 ^{ab}	17.6 ^b	15.6 ^b

1) Mean \pm SEM

2) Values with different superscripts within a parameter are significantly different at $p < 0.05$

결 과

구리 결핍이 배아 발달과 난황낭 혈관 발달에 미치는 영향

체질의 개수와 배아의 길이는 각 군간 유의적인 차이가 없었으나, 구리 결핍 배아는 구리 정상 배아에 비해 낮은 발달 지수와 높은 빈도의 발달 이상을 보였다 (Table 1). 특히 심장, 뇌, 난황낭이 구리 결핍에 의해 가장 큰 영향을 받았고, Table 1에서와 같이 다양한 양상의 발달 이상을 보였다. 구리 결핍 배아의 abnormal/swollen heart, pericardium effusion, open anterior neuropore의 발달 이상 빈도와 구리 결핍 난황낭의 비정상적인 혈관형성, blood pooling과 blood islands의 존재의 빈도는 대조군에 비해 유의적으로 높았다 (Table 1).

Nitric oxide 농도와 아세틸콜린에의 반응성

NOS 억제제인 L-NMMA의 2시간 동안의 처리는 모든 군의 배아와 난황낭이 배양된 표본 배양액에서의 NO 농도

Table 2. Nitric oxide (NO) concentrations in conditioned medium after 2 hr incubation of *in vitro* Cu adequate (Cu+/Cu+) and Cu deficient (Cu-/Cu-) embryo and yolk sac in the presence or absence of a NOS inhibitor (L-NMMA; 10 mM). NO concentrations are expressed as nmol NO/mg protein

	Cu+/Cu+	Cu-/Cu-
Embryo		
L-NMMA	0.18 ± 0.04 ¹⁾	0.23 ± 0.07
Untreated	5.05 ± 0.98	3.59 ± 0.24 ^{*2)}
Yolk sac		
L-NMMA	0.61 ± 0.17	0.42 ± 0.18
Untreated	13.71 ± 0.90	7.90 ± 0.32*

1) Mean ± SEM (n = 6-10/group)

2) *: p<0.05 compared to Cu+/Cu+ controls

를 낮은 수준으로 감소시켰다 (Table 2). 구리 결핍 배아와 난황낭이 2시간 동안 배양된 표본 배양액에서의 NO 농도는 대조군에 비해 유의적으로 낮았다.

구리 결핍 배아와 난황낭이 NOS 촉진제인 아세틸콜린에 대해 대조군과 다른 dose-response를 가지는지를 알아보기 위해, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM, 100 mM의 아세틸콜린을 배양액에 첨가하였다. 2시간 배양 후 수집된 표본 배양액으로부터 NO 농도를 측정하여 아세틸콜린에 대한 dose-response curve를 생성하였고, 구리 결핍 배아와 난황낭이 대조군에 비해 아세틸콜린에 대한 감소된 반응성을 가진다는 것을 보여주었다 (Fig. 1).

Nitric oxide synthase isoforms의 mRNA 발현

Real-time RT-PCR에 의한 3개의 NOS isoform의 mRNA 발현 분석 결과, nNOS와 iNOS mRNA 발현은 각 군간 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 2). 그러나, 구리 결핍 난황낭의 eNOS mRNA 발현은 대조군에 비해 유의적으로 낮았다.

Nitric oxide donor 및 SOD 처리가 구리 결핍 배아의 발달과 난황낭 혈관 발달에 미치는 영향

구리 결핍 배양액에 NO donor인 DETA/NONOate를 처리한 결과 구리 결핍 배아와 난황낭의 발달 이상 빈도는 구리 정상군의 수준으로 유의적으로 감소되었다 (Table 1). Table 1에서 보이는 바와 같이 NO donor에 의한 개선은 발달 지수 뿐만 아니라 난황낭, 심장, 뇌 등의 발달 이상 발생 빈도에서도 두드러졌고, Fig. 3에서 보이는 바와 같이 NO donor가 첨가된 배양액에서 배양된 구리 결핍 배아와 난황낭은 구리 정상군과 유사한 발달 형태를 보였다. Cu-Zn SOD 첨가는 NO 첨가에 비해 낮은 수준의 개선도를 보였

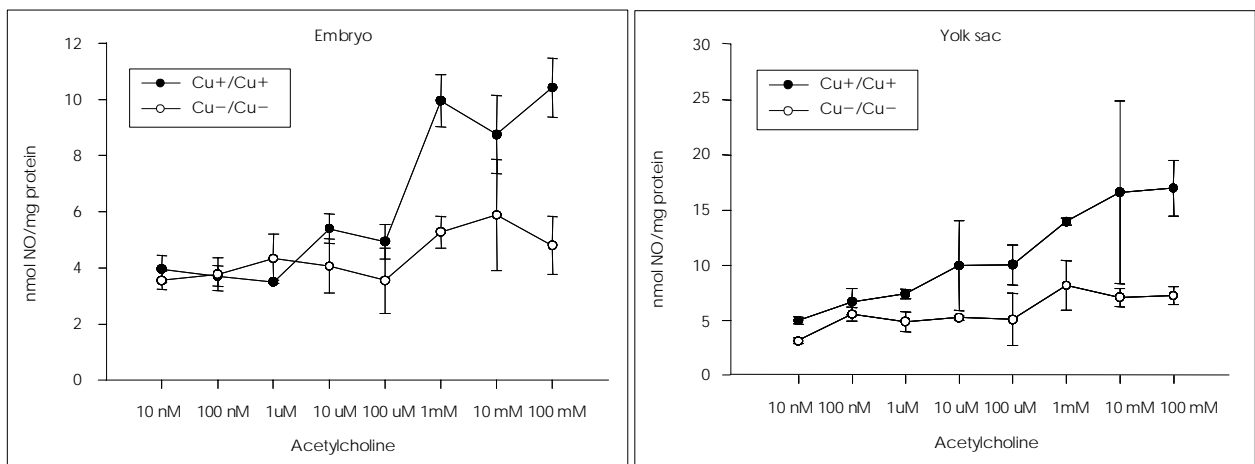


Fig. 1. Nitric oxide (NO) concentrations in conditioned medium from single cultured Cu adequate (Cu+/Cu+) and Cu deficient (Cu-/Cu-) embryo and yolk sac in response to increasing concentrations of the NOS agonist, acetylcholine. Values are expressed as mean ± SEM (n = 3-8/group).

고, 특히 난황낭 발달 이상은 무처리 구리 결핍군에 비해 유의적으로 개선되었다. Cu-Zn SOD 처리는 무처리 구리 결핍 배아에 비해 심장 발달 이상을 47% 정도 낮추는 효과를 보였지만 이는 통계적 유의성을 가지지 않았고, 뇌 발달 이상 빈도에는 아무런 영향을 미치지 않았다. NO donor 와 Cu-Zn SOD의 혼합 처리는 NO donor 혹은 Cu-Zn SOD의 단독 처리 개선도의 중간 수준의 개선도를 보였다.

Cyclic GMP 농도

구리 결핍 배아의 cGMP 농도 (0.13 ± 0.02 pmol cGMP/mg protein, n = 6)는 대조군 (0.23 ± 0.03 pmol cGMP/mg protein, n = 6)에 비해 낮은 경향을 보였으나 통계적

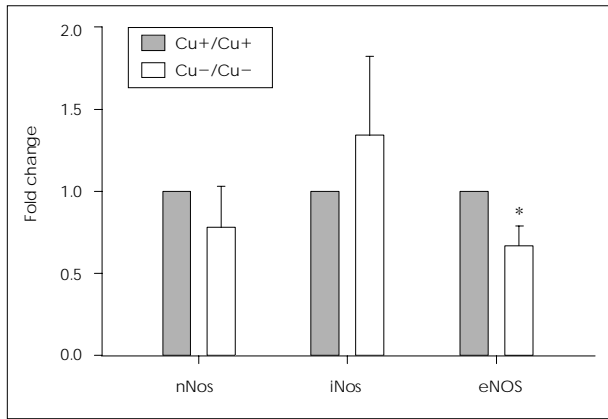


Fig. 2. Quantification of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS (eNOS) mRNA transcript levels by real-time RT-PCR in GD 8.5 Cu+/Cu+ and Cu-/Cu- yolk sacs after 48 hr culture. mRNA expression of each NOS isoform was normalized to 18S rRNA and expressed as fold change relative to Cu+/Cu+ controls (n = 5/group). *: p < 0.05 compared to Cu+/Cu+ controls.

으로 유의적인 차이는 보이지 않았다. 구리 결핍 난황낭의 cGMP 농도 (0.20 ± 0.05 pmol cGMP/mg protein, n = 7)는 대조군 (0.42 ± 0.07 pmol cGMP/mg protein, n = 7)에 비해 유의적으로 낮았다 (p = 0.037). 구리 결핍 배양액에의 NO donor의 첨가는 구리 결핍 배아와 난황낭의 cGMP 농도를 무처리 구리 결핍군에 비해 유의적으로 증가시켰다 (배아 0.42 ± 0.12 , 난황낭 0.77 ± 0.23 pmol cGMP/mg protein; n = 6~7; 각각 p = 0.028, p = 0.031 versus 무처리 구리 결핍군).

Phosphorylation of VASP at Serine 239

구리 결핍이 NO/cGMP 하위 신호전달체계 표적에 영향을 미치는지를 알아보기 위해, VASP의 239번 serine에서의 인산화 (P-VASP)를 western blotting에 의해 측정하였다. 본 실험에서 사용된 착상 후 단계의 배아 (Fig. 4A)와 난황낭 (Fig. 4B)에서 VASP과 P-VASP은 측정 가능한 수준으로 발현되었다. 그러나, 구리 결핍과 NO donor 첨가는 P-VASP의 수준에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4C).

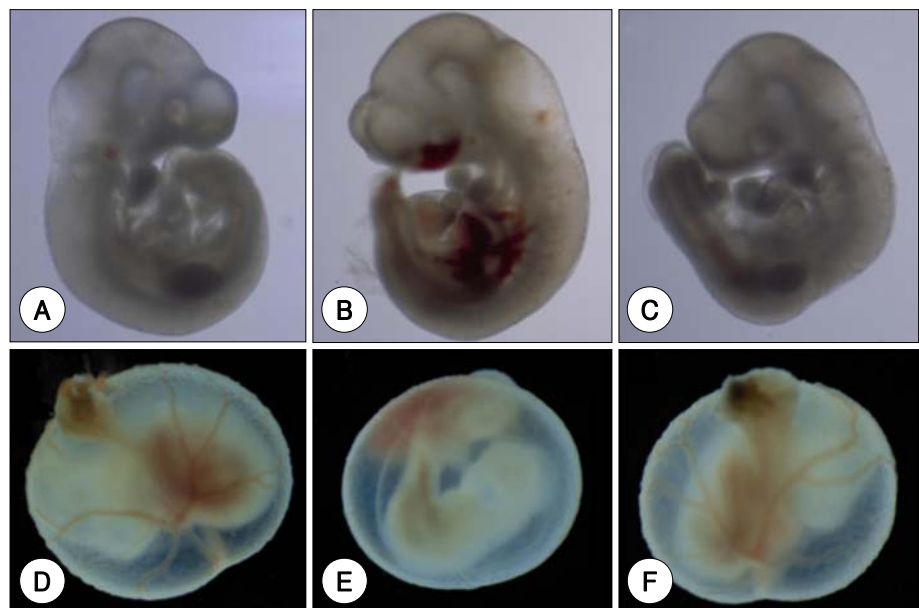
3-nitrotyrosine 농도

구리 결핍 배아와 난황낭은 대조군에 비해 각각 57%와 79% 증가된 수준의 3-NT 농도를 보였으나, 그 증가는 통계적으로 유의적이지 않았다 (Fig. 5). NO donor 첨가는 3-NT 농도에 영향을 미치지 않았다.

고 찰

이전의 연구^{26,27)}에서 보고된 바와 같이, 구리 결핍 쥐 배

Fig. 3. Effects of NO donor supplementation to Cu deficient media on *in vitro* embryo and yolk sac development. Cu adequate embryo (A) and yolk sac (D) cultured in Cu adequate medium (Cu+/Cu+) show normal development. Cu deficient embryo (B) cultured in Cu deficient medium (Cu-/Cu-) exhibits hemorrhages and hindbrain distension. Cu-/Cu- yolk sac (E) shows typical anomalies including reduced vascularization and the presence of blood pooling. When Cu-/Cu- embryos and yolk sacs were cultured in Cu deficient medium supplemented with NO donor (Cu-/Cu- + NO donor), the incidence of embryo (C) and yolk sac (F) abnormalities was markedly reduced.



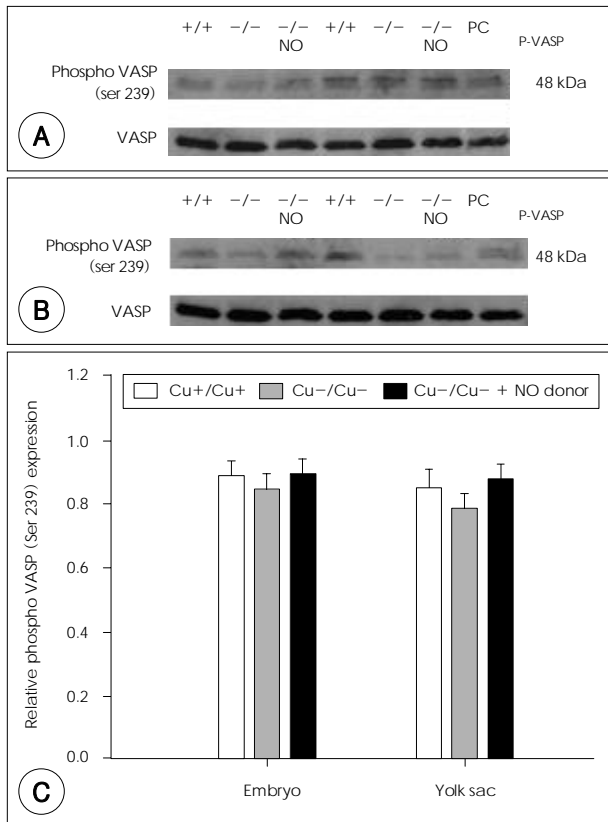


Fig. 4. Phosphorylation status of VASP at serine 239 in cultured Cu adequate (Cu+/Cu+; +/+), Cu deficient (Cu-/Cu-; -/-), and Cu deficient with NO donor supplementation (Cu-/Cu- + NO donor; -/- NO) embryos (A) and yolk sacs (B). Cell lysate of human umbilical vein endothelial cells induced with vascular endothelial growth factor was used as positive control (PC_{P-VASP}). (C) Phospho VASP (Ser 239) was normalized to VASP expression and values are expressed as mean ± SEM (n = 5-6/group).

아와 난황낭은 낮은 발달 지수와 높은 빈도의 발달 이상을 나타내었다. 또한, 구리 결핍 배아와 난황낭이 낮은 수준의 NO 생물학적 이용도를 가지고 있을 뿐만 아니라, 아세틸콜린에 대한 억제된 NO dose-response를 가진다는 것을 보여주었다. Schuschke 등³⁰⁾은 쥐의 식이 구리 결핍이 세동맥 내피 세포의 칼슘 동원과 아세틸콜린에 대한 혈관이완작용을 억제시킨다고 보고했는데, 이는 세포내 칼슘 동원 및 칼슘에 의존적인 eNOS 활성화의 억제가 NO 이용도와 아세틸콜린에 대한 dose-response를 감소시킬 수 있다는 것을 제안한다. 구리 결핍군에서의 감소된 NO가 NOS isoforms의 감소된 발현으로 인한 것인지를 알아보기 위해 nNOS, iNOS, eNOS의 mRNA 발현이 real-time RT-PCR에 의해 분석되었고, 구리 결핍 난황낭에서 eNOS mRNA 발현의 감소가 보여졌다. 이는 eNOS 활성화의 억제 뿐 아니라 그 발현의 감소가 구리 결핍에서의 낮은 NO 이용도와 아세틸콜린에 대한 낮은 NO 반응도에 기여할 수 있다는 것을 시사한다.

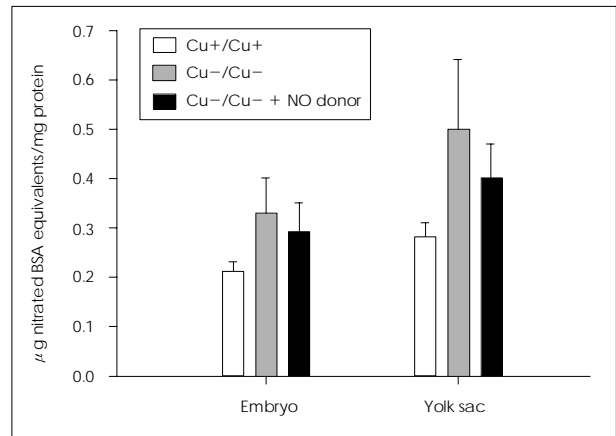


Fig. 5. 3-nitrotyrosine concentrations in cultured Cu adequate (Cu+/Cu+), Cu deficient (Cu-/Cu-), and Cu deficient with NO donor supplementation (Cu-/Cu- + NO donor) embryos and yolk sacs. Values are expressed as mean ± SEM (n = 5-6/group).

구리 결핍 배아와 난황낭이 낮은 Cu-Zn SOD 활성과 NO 이용도를 가진다는 것에 근거하여, NO와 superoxide anions 농도를 조절하는 것이 구리 결핍으로 인한 기형발생을 줄일 수 있다고 가정하고 이를 검증해보았다. 구리 결핍 배양액에 Cu-Zn SOD를 첨가하는 것은 난황낭 발달 이상의 빈도를 유의적으로 감소시켰다. Cu-Zn SOD의 첨가에 의한 난황낭 발달 이상의 감소는 1) superoxide anions 농도의 감소, 혹은 2) superoxide anions의 증가에 의한 peroxynitrite의 생성 감소 혹은 NOS 활성 증가에 의한 NO의 생물학적 이용도 증가에 의한 것일 수 있는데, 직접적인 작용 기전이 무엇인지는 명확하지 않다. Cu-Zn SOD의 첨가는 뇌의 발달 이상 빈도에는 영향을 미치지 않았는데, 이는 이전의 연구 결과들과 일치한다.^{26,38)} 반면, NO donor 첨가는 구리 결핍 배아와 난황낭의 발달 지수를 구리 정상군의 수준으로 정상화시켰고, 발달 이상 빈도를 현저하게 감소시켰다. 이는 구리 결핍에 의해 영향을 받은 NO 대사의 변화가 발달 과정에 있어 중요한 영향을 미친다는 본 연구의 가정을 뒷받침한다. 또한, NO donor의 첨가로 인해 총 NO 이용도를 증가시켰으므로 NO 신호전달경로를 활성화시켜 배아 발달을 정상적으로 개선시킬 수 있는 것이라고 보여진다. 흥미롭게도, NO donor와 Cu-Zn SOD의 혼합 처리는 기대했던 상승 효과를 보이지 않았고, 각각의 단독 처리의 중간 수준의 개선도를 보였다. 혼합 처리가 NO 단독 처리보다 더 높은 개선 효과를 보이지 않은 것은 사용된 NO donor와 Cu-Zn SOD의 농도가 적절하지 않아서 일 수 있다. NO donor 단독 처리시 정상 수준으로의 개선 효과를 보였을지라도 Cu-Zn SOD와의 혼합 사용시는 두 물질의 상호 작용을 고려하여 적정 농도로 조절되어야 할 것으로 사료된다.

구리 결핍 배양액에 NO donor를 첨가하는 것이 가장 효과적이었으므로, NO donor 처리군의 분석 결과만을 무처리군과의 비교 분석에 사용하였다. 구리 결핍이 NO 하부 신호전달체계에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 NO 하부 신호전달체계 표적물질로서 cGMP와 P-VASP이 분석되었다. cGMP와 P-VASP은 발달에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. cGMP는 착상 전 단계의 배아 발달을 조절하는 것으로 보고되고 있는데,^{39,40)} NOS 억제제 처리는 2-세포 단계의 배아 발달을 저해시켰고 이는 cGMP 유사물의 첨가로 인해 정상화되었다.⁴⁰⁾ 구리 결핍이 낮은 수준의 cGMP를 유도한다는 것은 구리 결핍이 발달 과정 동안 NO/cGMP 신호전달체계를 억제하여 발달 이상을 일으킨다는 것을 제안한다.

VASP군의 유전자들 (Mena, VASP)을 제거하는 실험들은 하나의 유전자 제거는 기형을 유발하지 않지만,^{41,42)} Mena VASP을 둘 다 제거한 쥐는 신생아 단계를 전후로 사망하고 심각한 신경관 및 얼굴 부위 기형을 가진다는 것을 보여준다.⁴³⁾ 구리 결핍군에서 cGMP 농도가 감소되었음에도 불구하고, 구리 결핍은 VASP의 인산화 정도에는 영향을 미치지 않았다. VASP은 PKG에 의해 239번 serine이 인산화되고 PKA에 의해 157번 serine이 인산화되는 48 kDa 크기의 단백질이다. 특정 serine 잔기에서 VASP을 인산화시키는 PKG의 특성으로 인해, P-VASP (Ser 239)은 NO/cGMP 신호전달체계와 PKG 활성의 표지인자로 간주된다. 구리 결핍이 cGMP 농도를 감소시켰을지라도, P-VASP (Ser 239)은 구리 결핍 혹은 NO donor 첨가에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 P-VASP이 구리 chelator에 의한 Cu-Zn SOD의 억제 등에 의해 유도된 산화적 스트레스 상황에서 NO 대사의 변화를 반영한다는 것을 보여준 다른 연구 결과들^{19,20)}과 일치하지 않는다. 내피세포 기능이상과 NO/cGMP 하부 신호전달체계의 표지인자로서 P-VASP의 중요성이 명백하다 할지라도, 본 연구 결과는 P-VASP (Ser 239)은 착상 후 단계의 배아 발달 과정에는 관여하지 않을 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

구리 결핍에 의한 superoxide anions의 증가로 인한 두 가지 영향은 1) peroxynitrite의 생성 증가와 2) 생물학적으로 이용 가능한 NO의 감소이다. 기존의 연구 결과들^{26,30)}과는 달리 본 연구 결과는 구리 결핍이 단백질 nitration의 표지인자인 3-NT 농도를 유의적으로 증가시킨다는 것을 보여주지 않았다. 이는 표본 집단이 작고 3-NT 농도의 큰 변이로 인한 것으로 사료된다. 구리 결핍 배아와 난황낭이 높은 수준의 3-NT의 경향을 보였을지라도, 3-NT 분석은 보다 큰 표본 집단을 대상으로 반복되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 착상 후 단계의 쥐 배아와 난황낭을 대상으로 구리 결핍이 NO 하부 신호전달체계에 영향을 주는지를 알아보기 위한 것으로, 연구 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다. 첫째, 구리 결핍은 정상적인 배아 및 난황낭 발달을 억제하고, NO의 생물학적 이용도와 아세틸콜린에 대한 NO dose-response를 낮추었다. 둘째, 구리 결핍은 NO의 하부 신호전달 물질인 cGMP 수준을 감소시켰으나, NO/cGMP 하부 신호전달체계 표적 중 하나인 P-VASP에는 영향을 미치지 않았다. 셋째, 구리 결핍 배양액에 NO donor를 첨가하는 것은 구리 결핍 배아와 난황낭의 기형 발생 빈도를 구리 정상군과 비슷한 수준으로 개선시켰다. 넷째, NO donor 첨가는 구리 결핍군에서 감소되었던 cGMP의 농도를 유의적으로 증가시켰지만, P-VASP에는 영향을 미치지 않았다.

상기 연구 결과들은 구리 결핍으로 인한 NO의 생물학적 이용도의 감소가 기형발생의 주요 발생 기전이라는 것을 뒷받침하고 있다. 또한, 임상적으로 임신 기간 중 적절한 구리 섭취의 중요성을 강조한다.

Literature cited

- 1) Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 2001; 7(4): 801-819
- 2) Thippeswamy T, McKay JS, Quinn JP, Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad?. *Histol Histopathol* 2006; 21(4): 445-458
- 3) Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, Klintland N, Nilsson L, Brannstrom M, Norstrom A. Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16(7): 1334-1339
- 4) Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6(2): 95-101
- 5) Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(3): 262-268
- 6) Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998; 58(4): 875-879
- 7) Nath AK, Madri JA. The roles of nitric oxide in murine cardiovascular development. *Dev Biol* 2006; 292(1): 25-33
- 8) Young SL, Evans K, Eu JP. Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(3): 379-385
- 9) Hefler LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR. Perinatal devel-

- opment of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2001; 64 (2): 666-673
- 10) Nath AK, Enciso J, Kuniyasu M, Hao XY, Madri JA, Pinter E. Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy. *Development* 2004; 131 (10): 2485-2496
 - 11) Fantel AG, Nekahi N, Shepard TH, Cornel LM, Unis AS, Lemire RJ. The teratogenicity of N (omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, in rats. *Reprod Toxicol* 1997; 11 (5): 709-717
 - 12) Fantel AG, Stamps LD, Tran TT, Mackler B, Person RE, Nekahi N. Role of free radicals in the limb teratogenicity of L-NAME (N(G)-nitro-(L)-arginine methyl ester): a new mechanistic model of vascular disruption. *Teratology* 1999; 60 (3): 151-160
 - 13) Shukovski L, Tsafirri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 1994; 135 (5): 2287-2290
 - 14) Jablonka-Shariff A, Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139 (6): 2944-2954
 - 15) Han RN, Babaei S, Robb M, Lee T, Ridsdale R, Ackerley C, Post M, Stewart DJ. Defective lung vascular development and fatal respiratory distress in endothelial NO synthase-deficient mice: a model of alveolar capillary dysplasia? *Circ Res* 2004; 94 (8): 1115-1123
 - 16) Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasserri B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001; 104 (11): 1286-1291
 - 17) Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP. Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106 (7): 873-879
 - 18) Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmuller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Munzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002; 105 (10): 1170-1175
 - 19) Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO, Mameghani A, Schmidt HH. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol Pharmacol* 2002; 61 (2): 312-319
 - 20) Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* 2000; 87 (11): 999-1005
 - 21) Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6 (4): 221-230
 - 22) Klevay LM. Cardiovascular disease from copper deficiency--a history. *J Nutr* 2000; 130 (2S Suppl): 489S-492S
 - 23) Penland JG, Prohaska JR. Abnormal motor function persists following recovery from perinatal copper deficiency in rats. *J Nutr* 2004; 134 (8): 1984-1988
 - 24) Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J Nutr* 2003; 133 (5 Suppl 1): 1477S-1480S
 - 25) Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, Rucker RB. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 1998; 67 (5 Suppl): 1003S-1011S
 - 26) Beckers-Trapp ME, Lanoue L, Keen CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Abnormal development and increased 3-nitrotyrosine in copper-deficient mouse embryos. *Free Radic Biol Med* 2006; 40 (1): 35-44
 - 27) Yang SJ, Uriu-Adams JY, Keen CL, Rucker RB, Lanoue L. Effects of copper deficiency on mouse yolk sac vasculature and expression of angiogenic mediators. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2006; 77 (5): 445-454
 - 28) Amirmansour C, Vallance P, Bogle RG. Tyrosine nitration in blood vessels occurs with increasing nitric oxide concentration. *Br J Pharmacol* 1999; 127 (3): 788-794
 - 29) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87 (1): 315-424
 - 30) Schuschke DA, Falcone JC, Saari JT, Fleming JT, Percival SS, Young SA, Pass JM, Miller FN. Endothelial cell calcium mobilization to acetylcholine is attenuated in copper-deficient rats. *Endothelium* 2000; 7 (2): 83-92
 - 31) Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005; 511 (1): 53-64
 - 32) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87 (10): 840-844
 - 33) Kelm M, Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway. *Basic Res Cardiol* 2001; 96 (2): 107-127
 - 34) Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 1: 2-5
 - 35) Lynch SM, Frei B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Xu A, Jackson T, Reyna R, Klevay LM, Vita JA, Keaney JF Jr. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (11): 2975-2981
 - 36) Schuschke DA, Saari JT, Miller FN. A role for dietary copper in nitric oxide-mediated vasodilation. *Microcirculation* 1995; 2 (4): 371-376
 - 37) Brown NA. Routine assessment of morphology and growth: scoring system and measurements of size. In: Copp AJ, Cockcroft DL, editor. Postimplantation mammalian embryos: a practical approach. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1990. p.93-108
 - 38) Hawk SN, Uriu-Hare JY, Daston GP, Jankowski MA, Kwik-Urbe C, Rucker RB, Keen CL. Rat embryos cultured under copper-deficient conditions develop abnormally and are characterized by an impaired oxidant defense system. *Teratology* 1998; 57: 310-320
 - 39) Krumenacker JS, Murad F. NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Mol Genet Metab* 2006; 87 (4): 311-314

- 40) Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 2001; 75 (6): 1163-1171
- 41) Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J* 1999; 18 (1): 37-48
- 42) Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 1999; 22 (2): 313-325
- 43) Menzies AS, Aszodi A, Williams SE, Pfeifer A, Wehman AM, Goh KL, Mason CA, Fassler R, Gertler FB. Mena and vasodilator-stimulated phosphoprotein are required for multiple actin-dependent processes that shape the vertebrate nervous system. *J Neurosci* 2004; 24 (37): 8029-8038